

Attorney Docket No.

PATENT

ST9401

MAY 28 2002

TECH CENTER 1600/2900

RECEIVED

#37
MB
05/30/02

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of:

Laurant PRADIER *et al.*

Appl. No.: 08/716,209

Filed: October 9, 1996

For: RECOMBINANT
ADENOVIRUSES CODING FOR
BRAIN-DERIVED
NEUROTROPHIC FACTOR
(BDNF)

Art Unit: 1647

Examiner: S. Gucker

**SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT
AND CERTIFIED TRANSLATION INTO ENGLISH LANGUAGE**

Commissioner for Patents
Washington DC 20231

Sir:

Applicants enclose herewith a certified copy of French Application No. 94 03191, which was filed in France on March 18, 1994. Applicants also enclose a certified translation of the French Application into the English language. These documents perfect applicants' claim for priority made upon the filing of the above-captioned patent application in the U.S. Patent and Trademark Office on September 17, 1996.

No fee is believed to be necessary with this submission. However, should the U.S. Patent and Trademark Office determine that a fee is required or due upon the filing of these documents, the Commissioner is hereby authorized to charge Deposit Account No. 50-1129 for any fees.

Respectfully submitted,
WILEY REIN & FIELDING LLP

Date: May 23, 2002

By:


David I. Kulik; Reg. No. 36,576

WILEY REIN & FIELDING LLP
Attn: Patent Administration
1776 K Street, N.W.
Washington, D.C. 20006
Telephone: 202.719.7000
Facsimile: 202.719.7049

RECEIVED
MAY 1 1963
LIBRARY



RECEIVED
MAY 28 2002
TECH CENTER 160012900

BREVET D'INVENTION



CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

14 JUIN 2001

Fait à Paris, le

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30
<http://www.inpi.fr>

REQUÊTE

EN DÉLIVRANCE D'UN TITRE DE PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE *

2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT
L'ÉTABLISSEMENT DIFFÈRE
DE L'AVIS DOCUMENTAIRE *
☐ OUI
☒ NON
SI L'OPTION CHOISIE EST NON ET
SI LE DEMANDEUR EST UNE
PERSONNE PHYSIQUE IL
REQUIERT LE PAIEMENT
ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE
D'AVIS DOCUMENTAIRE *
☐ OUI
☒ NON

NATURE

NUMÉRO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

a	<input checked="" type="checkbox"/>	BREVET D'INVENTION
b	<input type="checkbox"/>	CERTIFICAT D'UTILITÉ
c	<input type="checkbox"/>	DEMANDE DIVISIONNAIRE
d	<input type="checkbox"/>	TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

Pour a et d, précisez : Nature N° et date de la
demande initiale

DATE DE REMISE DES PIÈCES

18 MAR 1994

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

94 03191

DATE DE DÉPÔT

18 MARS 1994

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

4 NUMÉRO DU POUVOIR PERMANENT

15 janvier 1991

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

ST94014

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

40 91 70 36

7 TITRE DE L'INVENTION

VIRUS RECOMBINANTS, PRÉPARATION ET UTILISATION EN
THÉRAPIE GÉNÉRIQUE

8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

N° SIREN

RHONE-POULENC RORER SA
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
INSTITUT GUSTAVE ROUSSY

9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

20 ave. Raymond Aron, 92160 Antony
3 Rue Michel Ange, 75016 Paris
XXXXXXX
39 Rue Camille Desmoulins, 94800 VILLEJUIF

PAYS

France

10 NATIONALITÉ(S)

Française

☒ DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSÉES

☒ D'AVIS DOCUMENTAIRE☐ DE REVENDICATION DE PRIORITÉ☒ DE REVENDICATION (à partir de la 116)

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE
INVENTEUR *☐ OUI

Si la réponse est non voir notice explicative

☒ NON

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE
PHYSIQUE NON IMPOSABLE, IL
REQUIERT* OU A REÇU LA RÉDUCTION
DES REDEVANCES*☐ OUI☒ NON

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE OU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES À LA
PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

N°

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
NOM ET QUALITÉ DU SIGNATAIRE
RHONE-POULENC RORER SA
Fondé de Pouvoir

Philippe BECKER

SIGNATURE DU DÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

Division Administrative des Brevets

ST 94014

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national

94 03191

Titre de l'invention :

VIRUS RECOMBINANTS, PREPARATION ET UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE

Le (s) soussigné (s)

RHONE-POULENC RORER SA, 20 Ave. Raymond Aron, 92160 ANTONY

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, 3 rue Michel Ange, 75016 PARIS

INSTITUT GUSTAVE ROUSSY, 39 rue Camille Desmoulins, 94800 VILLEJUIF

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

PRADIER Laurent - 5 bis rue d'Alésia, 75014 PARIS

BARNEOUD Pascal - 1 avenue Anatole France, 94600 CHOISY LE ROI

DELAERE Pia - 108 bis Boulevard Auguste Blanqui, 75013 PARIS

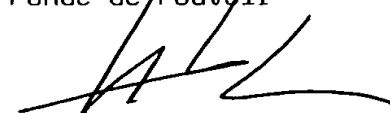
PERRICAUDET Michel - 31 rue de Chartres, 28320 ECROSNE

VIGNE Emmanuelle - 60 rue Jean Le Galleu, 94200 IVRY SUR SEINE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Antony, le 18 mars 1994
RHONE-POULENC RORER SA
Fondé de Pouvoir



Philippe BECKER

ORIGINAL

VIRUS RECOMBINANTS. PREPARATION ET UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE

La présente invention concerne des vecteurs recombinants d'origine virale et leur utilisation pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives. Plus particulièrement, elle concerne des adénovirus recombinants comportant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF, "brain-derived neurotrophic factor"). L'invention concerne également la préparation de ces vecteurs, les compositions pharmaceutiques les contenant et leur utilisation thérapeutique, notamment en thérapie génique.

Les maladies neurodégénératives représentent une large part des dépenses de santé dans les pays occidentaux, part qui ne cesse de s'accroître suite au vieillissement de la population. Au titre de ces affections, on peut citer notamment la maladie d'Alzheimer, le maladie de Parkinson, la chorée de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique, etc. Les signes pathologiques et l'étiologie de ces maladies sont fort variés, mais toutes ces maladies résultent d'une perte progressive de cellules neuronales dans le système nerveux central, parfois au sein de structure très localisées comme la substance noire dans la maladie de Parkinson. Bien que certains traitements pharmacologiques palliatifs soient déjà disponibles, leurs effets sont relativement limités. La présente invention décrit une approche thérapeutique nouvelle, particulièrement avantageuse pour le traitement de ces maladies. Plus particulièrement, la présente invention décrit des vecteurs permettant de promouvoir directement la survie des cellules neuronales impliquées dans ces pathologies, par expression efficace et localisée de certains facteurs trophiques.

Les facteurs trophiques sont une classe de molécules ayant des propriétés de stimulation de la croissance neuritique ou de la survie des cellules nerveuses. Le premier facteur possédant des propriétés neurotrophiques, le NGF ("Nerve Growth Factor"), a été caractérisé il y a une quarantaine d'années (pour revue, voir Levi-Montalcini et Angelletti, *Physiol. Rev.* 48 (1968) 534). Ce n'est que récemment que d'autres facteurs neurotrophiques ont été identifiés, et notamment le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) (Thoenen, *Trends in NeuroSci.* 14 (1991) 165). Le BDNF est une protéine de 118 acides aminés et de poids moléculaire 13,5 kD. In vitro, le BDNF stimule la formation de neurites et la survie en culture des neurones ganglionnaires de la rétine, des motoneurones de la moelle épinière, des

neurones cholinergiques du septum ainsi que des neurones dopaminergiques du mésencéphale (revue par Lindsay in Neurotrophic Factors, Ed, (1993) 257, Academic Press). Toutefois, bien que ses propriétés soient intéressantes, l'application thérapeutique du BDNF se heurte à différents obstacles. En particulier, l'absence de biodisponibilité du BDNF limite toute utilisation thérapeutique. Par ailleurs, il n'existe pas de moyens efficaces permettant de délivrer le BDNF de manière durable et localisée à certaines régions désirées de l'organisme. Enfin, il est essentiel que le BDNF délivré soit actif et puisse exercer une activité thérapeutique in vivo.

La présente invention apporte une solution particulièrement avantageuse à ces problèmes. La présente invention réside en effet dans la mise au point de vecteurs particulièrement efficaces pour délivrer in vivo et de manière localisée, des quantités thérapeutiquement actives de BDNF. Dans la demande copendante n° PCT/EP93/02519, il a été montré que les adénovirus pouvaient être utilisés pour le transfert de gènes in vivo dans le système nerveux. La présente invention concerne des constructions nouvelles, particulièrement adaptées et efficaces pour le transfert d'un gène spécifique dans le système nerveux. Plus particulièrement, la présente invention concerne un adénovirus recombinant comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), sa préparation, et son utilisation pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives.

La demanderesse a maintenant montré qu'il est possible de construire des adénovirus recombinants contenant une séquence codant pour le BDNF, d'administrer ces adénovirus recombinants in vivo, et que cette administration permet une expression stable et localisée de quantités thérapeutiquement actives de BDNF in vivo, et en particulier dans le système nerveux, et sans effet cytopathologique. Les propriétés particulièrement avantageuses des vecteurs de l'invention découlent notamment de la construction utilisée (adénovirus défectif, délété de certaines régions virales), du promoteur utilisé pour l'expression de la séquence codant pour le BDNF (promoteur viral ou tissu-spécifique de préférence), et des méthodes d'administration dudit vecteur, permettant l'expression efficace et dans les tissus appropriés du BDNF. La présente invention fournit ainsi des vecteurs viraux utilisables directement en thérapie génique, particulièrement adaptés et efficaces pour diriger l'expression du BDNF in vivo. La présente invention offre ainsi une nouvelle approche particulièrement avantageuse pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives.

Un premier objet de l'invention réside donc dans un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) ou un dérivé de celui-ci.

5 L'invention a également pour objet l'utilisation d'un tel adénovirus recombinant défectif pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention des maladies neurodégénératives.

Le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) produit dans le cadre de la présente invention peut être le BDNF humain ou un BDNF animal. La séquence d'ADN codant pour le BDNF humain et pour le BDNF de rat a été clonée et
10 séquencée (Maisonpierre et al., Genomics 10 (1991) 558), ainsi que notamment la séquence codant pour le BDNF de porc (Leibrock et al., Nature 341 (1989) 149). Préalablement à leur incorporation dans un vecteur adénovirus selon l'invention, ces séquences sont avantageusement modifiées, par exemple par mutagenèse dirigée, en particulier pour l'insertion de sites de restriction appropriés. Les séquences décrites
15 dans l'art antérieur ne sont en effet pas construites pour une utilisation selon l'invention, et des adaptations préalables peuvent s'avérer nécessaires, pour obtenir des expressions importantes (voir exemple 1.2.). Dans le cadre de la présente invention, on préfère utiliser une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF). Par ailleurs, comme indiqué ci-
20 avant, il est également possible d'utiliser une construction codant pour un dérivé du BDNF, en particulier un dérivé du BDNF humain. Un tel dérivé comprend par exemple toute séquence obtenue par mutation, délétion et/ou addition par rapport à la séquence native, et codant pour un produit conservant l'une au moins des propriétés biologiques du BDNF (effet trophique et/ou différenciateur). Ces modifications
25 peuvent être réalisées par les techniques connues de l'homme du métier (voir techniques générales de biologie moléculaire ci-après et exemple 2). L'activité biologique des dérivés ainsi obtenus peut ensuite être aisément déterminée, comme indiqué notamment dans l'exemple 3.. Les dérivés au sens de l'invention peuvent également être obtenus par hybridation à partir de banques d'acides nucléiques, en
30 utilisant comme sonde la séquence native ou un fragment de celle-ci.

Ces dérivés sont notamment des molécules ayant une plus grande affinité pour leurs sites de fixation, des séquences permettant une expression améliorée in vivo, des molécules présentant une plus grande résistance aux protéases, des

molécules ayant une efficacité thérapeutique plus grande ou des effets secondaires moindres, ou éventuellement de nouvelles propriétés biologiques.

Parmi les dérivés préférés, on peut citer plus particulièrement les variants naturels, les molécules dans lesquelles un ou plusieurs résidus ont été substitués, les dérivés obtenus par délétion de régions n'intervenant pas ou peu dans l'interaction avec les sites de liaison considérés ou exprimant une activité indésirable, et les dérivés comportant par rapport à la séquence native des résidus supplémentaires, tels que par exemple un signal de sécrétion et/ou un peptide de jonction. De manière particulièrement avantageuse, la séquence de la présente invention code pour le BDNF précédé de la région pro native (proBDNF).

Par ailleurs, il est particulièrement important pour une meilleure mise en oeuvre de la présente invention que la séquence utilisée contienne également un signal de sécrétion permettant de diriger le BDNF synthétisé dans les voies de sécrétion des cellules infectées, de manière à ce que le BDNF synthétisé soit libéré dans les compartiments extracellulaires et puisse activer ses récepteurs. Le signal de sécrétion est avantageusement le propre signal du BDNF. Mais il peut également s'agir d'un signal de sécrétion hétérologue ou même artificiel.

La séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau utilisée dans le cadre de la présente invention peut être un ADNc, un ADN génomique (ADNg), ou une construction hybride consistant par exemple en un ADNc dans lequel seraient insérés un ou plusieurs introns. Il peut également s'agir de séquences synthétiques ou semisynthétiques. Il est à noter que dans la séquence génomique codant pour le BDNF, les introns sont localisés dans les régions non codantes. De manière particulièrement avantageuse, on utilise un ADNc ou un ADNg. En particulier, l'utilisation d'un ADNg peut permettre une meilleure expression dans les cellules humaines.

Dans un premier mode de réalisation de l'invention, l'adénovirus comprend donc une séquence d'ADNc codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF). Dans un autre mode de réalisation préféré de l'invention, l'adénovirus comprend une séquence d'ADNg codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF). Avantageusement, la séquence d'ADN code pour le proBDNF et, de préférence, le préproBDNF.

Avantageusement, la séquence codant pour le BDNF est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules nerveuses. Préférentiellement, il s'agit de signaux d'expression hétérologues, c'est-à-dire de signaux différents de ceux naturellement responsables de l'expression du BDNF. Il peut s'agir en particulier de séquences responsables de l'expression d'autres protéines, ou de séquences synthétiques. Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs E1A, MLP, CMV, LTR-RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique. Il peut en effet être particulièrement intéressant d'utiliser des signaux d'expression actifs spécifiquement ou majoritairement dans les cellules nerveuses, de manière à ce que la séquence d'ADN ne soit exprimée et ne produise son effet que lorsque le virus a effectivement infecté une cellule nerveuse. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs de l'énolase neurone-spécifique, de la GFAP, etc.

Dans un premier mode de réalisation particulier, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF) sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNg codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF) sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.

La demanderesse a en effet montré que le promoteur LTR du virus du sarcome de rous (RSV) permettait une expression durable et importante du BDNF dans les cellules du système nerveux, notamment central.

Toujours dans un mode préféré, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF) sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans le système nerveux. Un mode particulièrement préféré de mise en oeuvre de la présente invention réside dans un adénovirus recombinant défectif comprenant les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, une séquence d'ADN codant pour le facteur

neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF) ou un dérivé de celui-ci sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans le système nerveux, et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 est non fonctionnel.

5 Les adénovirus défectifs selon l'invention sont des adénovirus incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des adénovirus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la répllication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues
10 non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par la séquence d'ADN codant pour le BDNF.

Préférentiellement, le virus défectif de l'invention conserve les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales. Encore plus
15 préférentiellement, comme indiqué ci-avant, le génome du virus recombinant défectif selon l'invention comprend les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, le gène E1 non fonctionnel et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 non fonctionnel.

Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la
20 présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande FR 93 05954). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De
25 préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

30 Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'ADN codant pour le BDNF. La
35 recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et

plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de
 5 lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° FR 93 05954 et FR 93 08596 qui sont incorporées à la présente par
 10 référence.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

Comme indiqué ci-avant, la présente invention concerne également toute utilisation d'un adénovirus tel que décrit ci-dessus pour la préparation d'une
 15 composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives. Plus particulièrement, elle concerne toute utilisation de ces adénovirus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention de la maladie de Parkinson, de la maladie d'Alzheimer, de la sclérose latérale amyotrophique (ALS), de la maladie
 20 d'Huntington, de l'épilepsie et de la démence vasculaire.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits précédemment. Ces compositions pharmaceutiques peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse,
 25 intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe dans le système nerveux du patient. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par
 30 addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. L'injection directe dans le système nerveux du patient est avantageuse car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés. L'injection directe dans le système nerveux central du patient est

avantageusement réalisée au moyen d'un appareil d'injection stéréotaxique. L'emploi d'un tel appareil permet en effet de cibler avec une grande précision le site d'injection.

5 A cet égard, l'invention concerne également une méthode de traitement des maladies neurodégénératives comprenant l'administration à un patient d'un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant. Plus particulièrement, l'invention concerne une méthode de traitement des maladies neurodégénératives comprenant l'administration stéréotaxique d'un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant.

10 Les doses d'adénovirus recombinant défectif utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par
15 infection d'une culture cellulaire appropriée, puis mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

Un autre objet de l'invention concerne toute cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits ci-dessus. Plus
20 particulièrement, l'invention concerne toute population de cellules humaines infectée par ces adénovirus. Il peut s'agir en particulier de fibroblastes, myoblastes, hépatocytes, kératinocytes, cellules endothéliales, cellules gliales, etc.

Les cellules selon l'invention peuvent être issues de cultures primaires. Celles-ci peuvent être prélevées par toute technique connue de l'homme du métier, puis mises en culture dans des conditions permettant leur prolifération. S'agissant
25 plus particulièrement de fibroblastes, ceux-ci peuvent être aisément obtenus à partir de biopsies, par exemple selon la technique décrite par Ham [Methods Cell.Biol. 21a (1980) 255]. Ces cellules peuvent être utilisées directement pour l'infection par les adénovirus, ou conservées, par exemple par congélation, pour l'établissement de
30 banques autologues, en vue d'une utilisation ultérieure. Les cellules selon l'invention peuvent également être des cultures secondaires, obtenues par exemple à partir de banques préétablies.

Les cellules en culture sont ensuite infectées par des adénovirus recombinants, pour leur conférer la capacité de produire du BDNF. L'infection est

réalisée in vitro selon des techniques connues de l'homme du métier. En particulier, selon le type de cellules utilisé et le nombre de copies de virus par cellule désiré, l'homme du métier peut adapter la multiplicité d'infection et éventuellement le nombre de cycles d'infection réalisé. Il est bien entendu que ces étapes doivent être effectuées dans des conditions de stérilité appropriées lorsque les cellules sont destinées à une administration in vivo. Les doses d'adénovirus recombinant utilisées pour l'infection des cellules peuvent être adaptées par l'homme du métier selon le but recherché. Les conditions décrites ci-avant pour l'administration in vivo peuvent être appliquées à l'infection in vitro.

Un autre objet de l'invention concerne un implant comprenant des cellules mammifère infectées par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs telles que décrites ci-dessus, et une matrice extracellulaire. Préférentiellement, les implants selon l'invention comprennent 10^5 à 10^{10} cellules. Plus préférentiellement, ils en comprennent 10^6 à 10^8 .

Plus particulièrement, dans les implants de l'invention, la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant et éventuellement un support permettant l'ancrage des cellules.

Pour la préparation des implants selon l'invention, différents types de gélifiants peuvent être employés. Les gélifiants sont utilisés pour l'inclusion des cellules dans une matrice ayant la constitution d'un gel, et pour favoriser l'ancrage des cellules sur le support, le cas échéant. Différents agents d'adhésion cellulaire peuvent donc être utilisés comme gélifiants, tels que notamment le collagène, la gélatine, les glycosaminoglycans, la fibronectine, les lectines, etc. De préférence, on utilise dans le cadre de la présente invention du collagène. Il peut s'agir de collagène d'origine humaine, bovine ou murine. Plus préférentiellement, on utilise du collagène de type I.

Comme indiqué ci-avant, les compositions selon l'invention comprennent avantageusement un support permettant l'ancrage des cellules. Le terme ancrage désigne toute forme d'interaction biologique et/ou chimique et/ou physique entraînant l'adhésion et/ou la fixation des cellules sur le support. Par ailleurs, les cellules peuvent soit recouvrir le support utilisé, soit pénétrer à l'intérieur de ce support, soit les deux. On préfère utiliser dans le cadre de l'invention un support solide, non toxique et/ou bio-compatible. En particulier, on peut utiliser des fibres de polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou un support d'origine biologique.

Les implants selon l'invention peuvent être implantés en différents sites de l'organisme. En particulier, l'implantation peut être effectuée au niveau de la cavité péritonéale, dans le tissu sous-cutané (région sus-pubienne, fosses iliaques ou inguinales, etc), dans un organe, un muscle, une tumeur, le système nerveux central, ou encore sous une muqueuse. Les implants selon l'invention sont particulièrement avantageux en ce sens qu'ils permettent de contrôler la libération du produit thérapeutique dans l'organisme : Celle-ci est tout d'abord déterminée par la multiplicité d'infection et par le nombre de cellules implantées. Ensuite, la libération peut être contrôlée soit par le retrait de l'implant, ce qui arrête définitivement le traitement, soit par l'utilisation de systèmes d'expression régulable, permettant d'induire ou de réprimer l'expression des gènes thérapeutiques.

La présente invention offre ainsi un moyen très efficace pour le traitement ou la prévention des maladies neurodégénératives. Elle est tout particulièrement adaptée au traitement des maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, et de l'ALS. Les vecteurs adénoviraux selon l'invention présentent en outre des avantages importants, liés notamment à leur très haute efficacité d'infection des cellules nerveuses, permettant de réaliser des infections à partir de faibles volumes de suspension virale. De plus, l'infection par les adénovirus de l'invention est très localisée au site d'injection, ce qui évite les risques de diffusion aux structures cérébrales voisines.

En outre, ce traitement peut concerner aussi bien l'homme que tout animal tel que les ovins, les bovins, les animaux domestiques (chiens, chats, etc), les chevaux, les poissons, etc.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

Figure 1 : Représentation du vecteur pXL2244

Figure 2 : Représentation du vecteur pSh-Ad-BDNF

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la

purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. **13** (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science **230** (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. **155** (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74** (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Exemples

Exemple 1 : Construction du vecteur pSh-Ad-BDNF.

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur comprenant une séquence d'ADN codant pour le BDNF sous le contrôle d'un promoteur constitué par le LTR du virus du sarcome de rous (LTR-RSV).

5 1.1. Vecteur de départ (pXL2244) : Le plasmide pXL2244 contient l'ADNc de l'ApoAI sous le contrôle du promoteur LTR du virus RSV, ainsi que des séquences de l'adénovirus Ad5 (figure 1). Il a été construit par insertion d'un fragment ClaI-EcoRV contenant l'ADNc codant pour la préproApoAI dans le vecteur pLTR RSV-Bgal (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626), digéré par les mêmes enzymes.

10 1.2. Clonage d'un ADNc codant pour le prepro-BDNF. L'ADNc complet codant pour le prepro-BDNF de rat (790 pb) a été cloné à partir d'une banque d'ADN génomique de rat par la technique de PCR, en utilisant comme amorce les oligonucléotides suivants :

Oligonucléotide 5' : 5'-TTCATCGAATTCCACCAGGTGAGAAG-3'

15 Oligonucléotide 3' : 5'-AATATAATCTAGACAACATAAATCC-3'

La région 5' de la séquence obtenue a ensuite été modifiée par insertion d'un site de restriction ClaI, 25 bases en amont de l'ATG. Ce site a été introduit par PCR au moyen des oligonucléotides suivants :

Oligonucléotide 5' : 5'-TAGCTTCATCGATTTCCACCAG-3'

20 Oligonucléotide 3' : 5'-AATATAATCTAGACAACATAAATCC-3'

La séquence ainsi obtenue a ensuite été sous-clonée dans le plasmide pCRII (Invitrogen) pour générer le plasmide pCRII-BDNF.

1.3. Construction du vecteur pSh-Ad-BDNF

25 Cet exemple décrit la construction du vecteur pSh-Ad-BDNF contenant la séquence codant pour le prepro-BDNF sous contrôle du LTR du virus RSV, ainsi que des séquences de l'adénovirus Ad5 permettant la recombinaison in vivo.

30 Le vecteur pCRII-BDNF a été digéré par les enzymes ClaI et KpnI, et le fragment de 0,85 kb résultant, contenant la séquence codant pour le prépro-BDNF a ensuite été isolé et purifié par électrophorèse sur un gel d'agarose LMP ("Low Melting Point"). Parallèlement, le vecteur pXL2244 a été digéré par les mêmes enzymes de restriction ClaI et KpnI, puis précipité après inactivation de ces dernières. Le vecteur linéaire résultant, préalablement isolé et purifié par électrophorèse sur un

gel d'agarose, et le fragment de 0,85 kb ont ensuite été ligaturés pour générer le vecteur pSh-Ad-BDNF (figure 2).

Exemple 2 : Construction du vecteur pSh-Ad-BDNFtag.

Cet exemple décrit la construction d'un second vecteur comprenant une
 5 séquence d'ADN de fusion codant pour le BDNF sous le contrôle d'un promoteur constitué par le LTR du virus du sarcome de rous (LTR-RSV).

2.1. Génération de l'ADN de fusion : Dans cet exemple, une forme alternative de la séquence d'ADN codant pour le prépro-BDNF a été construite. Cette forme a
 10 été obtenue par insertion, à l'extrémité 3' terminale de la séquence décrite dans l'exemple 1.2., d'une séquence codant pour un épitope de sept acides aminés (tag) reconnu par un anticorps disponible commercialement (IBI, Integra Biosciences, Eaubonne, France). La séquence de la région ainsi fusionnée est la suivante :

15 Arg Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp ***
 AGA GGC GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC TAG

 C-ter Seq. fusionnée
 BDNF

20

La séquence ainsi obtenue a ensuite été sous-clonée dans le plasmide pCRII (Invitrogen) pour générer le plasmide pCRII-BDNFtag.

2.2. Construction du vecteur pSh-Ad-BDNFtag

Cet exemple décrit la construction du vecteur pSh-Ad-BDNFtag contenant la
 25 séquence de fusion codant pour le prépro-BDNF sous contrôle du LTR du virus RSV, ainsi que des séquences de l'adénovirus Ad5 permettant la recombinaison in vivo.

Le vecteur pCRII-BDNFtag a été digéré par les enzymes ClaI et KpnI, et le fragment de 0,87 kb résultant, contenant la séquence codant pour le prépro-BDNFtag a ensuite été isolé et purifié par électrophorèse sur un gel d'agarose LMP ("Low
 30 Melting Point"). Parallèlement, le vecteur pXL2244 (exemple 1.1.) a été digéré par les mêmes enzymes de restriction ClaI et KpnI, puis précipité après inactivation de ces dernières. Le vecteur linéaire résultant, préalablement isolé et purifié par

électrophorèse sur un gel d'agarose, et le fragment de 0,87 kb ont ensuite été ligaturés pour générer le vecteur pSh-Ad-BDNFtag.

Exemple 3. Fonctionnalité des vecteurs pSh-Ad-BDNF et pSh-Ad-BDNFtag

5 La capacité des vecteurs pSh-Ad-BDNF et pSh-Ad-BDNFtag à exprimer sur culture cellulaire une forme biologiquement active du BDNF a été démontrée par transfection transitoire de cellules COS1. Pour cela, les cellules (2.10^6 cellules par boîte de 10 cm de diamètre) ont été transfectées (8 μ g de vecteur) en présence de Transfectam. Après 48 heures, le surnageant de culture des cellules a été récolté. Des
10 dilutions sérielles (1/200 et 1/50) de ce surnageant ont ensuite été ajoutées à des cultures primaires de neurones du septum (Hefti et al. In Dissection and Tissue cultures : Manual of the Nervous System (1989) 172, Alan R. Liss, Inc). L'effet trophique (survie cellulaire et pousse neuritique) sur ces cultures a été observé après coloration, et l'effet différenciateur par dosage de l'expression de l'enzyme choline
15 acétyl transférase (ChAT), selon la technique décrite par Fonnum (J. Neurochem. 24 (1975) 407).

Exemple 4. Construction des adénovirus recombinants contenant une séquence codant pour le BDNF

4.1. Construction de l'adénovirus Ad-BDNF

20 Le vecteur pSh-Ad-BDNF a été linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en *trans* les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Plus précisément, l'adénovirus Ad-BDNF a été obtenu par recombinaison homologue *in vivo* entre l'adénovirus mutant Ad-dl1324 (Thimmappaya et al., Cell
25 31 (1982) 543) et le vecteur pSh-Ad-BDNF, selon le protocole suivant : le plasmide pSh-Ad-BDNF et l'adénovirus Ad-dl1324, linéarisé par l'enzyme ClaI, ont été co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés ont été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus
30 recombinant a été amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus déficient recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus Ad-BDNF peut être conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

5

4.2. Construction de l'adénovirus Ad-BDNFtag

L'adénovirus Ad-BDNFtag a été construit selon le même protocole que l'adénovirus Ad-BDNF, mais en utilisant comme vecteur de départ le vecteur pSh-Ad-BDNFtag.

10

Exemple 5. Fonctionnalité de l'adénovirus Ad-BDNF

La capacité de l'adénovirus Ad-BDNF à infecter des cellules en culture et à exprimer dans le milieu de culture une forme biologiquement active du BDNF a été démontrée par infection des lignées 293 humaine et PC12 de rat. La présence de BDNF actif dans le surnageant de culture a ensuite été déterminée dans les mêmes conditions que dans l'exemple 3.

15

Ces études permettent de montrer que l'adénovirus exprime bien une forme biologiquement active du BDNF en culture cellulaire.

20

Exemple 6 : Transfert in vivo du gène BDNF par un adénovirus recombinant à des rats présentant une lésion du fimbria-fornix

Cet exemple décrit le transfert du gène BDNF in vivo au moyen d'un vecteur adénoviral selon l'invention. Il montre sur un modèle animal de la lésion du fimbria-fornix, que les vecteurs de l'invention permettent d'induire l'expression in vivo de quantités thérapeutiques de BDNF.

25

Sur des rats préalablement anesthésiés, la voie septo-hippocampique (fimbria-fornix) a été sectionnée au niveau de l'hémisphère gauche. Cette lésion mécanique a été réalisée à l'aide d'un couteau chirurgical rétractable. Les coordonnées stéréotaxiques utilisées à cet effet sont, par rapport au bregma : AP : -1,7; ML : +1,5; V : -5,5 à -0,5.

30

L'adénovirus recombinant BDNF a été injecté immédiatement après la lésion, dans le noyau médian du septum et dans la partie dorsale de l'hippocampe

déafférenté (hippocampe du côté de la lésion). Plus particulièrement, l'adénovirus injecté est l'adénovirus Ad-BDNF préparé dans l'exemple 4.1., utilisé sous forme purifiée ($3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l), dans une solution saline phosphate (PBS).

5 Les injections sont réalisées à l'aide d'une canule (diamètre extérieur 280 μ m) connectée à une pompe. La vitesse d'injection est fixée à 0,5 μ l/min, après quoi, la canule reste en place pendant 4 minutes supplémentaires avant d'être remontée. Les volumes d'injection dans l'hippocampe et le septum sont respectivement 3 μ l et 2 μ l. La concentration d'adénovirus injectée est de $3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l.

10 Pour l'injection dans l'hippocampe, les coordonnées stéréotaxiques sont les suivantes : AP=-4; ML=3,5; V=-3,1 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée V par rapport à la surface de l'os crânien au niveau du bregma.

15 Pour l'injection dans le septum, les coordonnées stéréotaxiques sont les suivantes : AP=1; ML=1; V=-6 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée V par rapport à la surface de l'os crânien au niveau du bregma. Dans cette condition, la canule présente un angle de 9 degrés par rapport à la verticale (dans le sens médio-latéral) afin d'éviter le sinus veineux médian.

20 Les effets thérapeutiques de l'administration de l'adénovirus selon l'invention ont été mis en évidence par trois types d'analyse : une analyse histologique et immunohistochimique, une analyse quantitative et une analyse comportementale.

Analyse histologique et immunohistochimique

25 La lésion mécanique du fimbria-fornix induit une perte de neurones cholinergiques (révélée en immunohistologie par un anticorps anti-choline acétyl transférase, ChAT) dans le septum médian, ainsi que la dénervation cholinergique dans l'hippocampe (détectée en histochimie par l'activité de l'acétyl choline estérase, AChE).

30 L'analyse histologique des cerveaux injectés est réalisée 3 semaines après l'injection intracérébrale de l'adénovirus Ad-BDNF. Pour cela, les animaux sont sacrifiés, sous anesthésie, par perfusion intracardiaque de 4% paraformaldéhyde. Après prélèvement, post-fixation et cryoprotection, le cerveau est coupé au cryomat selon le plan coronal : des coupes séries coronales de 30 μ m d'épaisseur sont

réalisées sur toute la longueur du septum médian et aux niveaux antérieur, médian et postérieur de l'hippocampe. Pour le septum médian, des coupes espacées de 180 μ m (1 coupe sur 6) sont colorées au crésyl violet (pour évaluer la densité neuronale) et immunomarquées par un anticorps anti ChAT (Biochem) (pour identifier les neurones cholinergiques). La méthode immunohistochimique est celle de la streptavidine-biotine peroxydase révélée par la DAB. Pour l'hippocampe, des coupes espacées de 180 μ m sont colorées selon la méthode histochemique pour l'AChE (acétyl choline estérase) afin de détecter l'innervation cholinergique. Les coupes sont montées sur lames de verre.

10 Analyse quantitative

Le nombre de neurones cholinergiques (ChAT positifs) dans le septum médian est le paramètre d'évaluation des effets de l'adénovirus Ad-BDNF. Le dénombrement est réalisé sur un échantillon (1 coupe sur 6 sur toute la longueur du septum médian). Pour chaque coupe, les neurones ChAT positifs sont dénombrés séparément des 2 cotés du septum. Les résultats cumulés pour toutes les coupes sont exprimés par le rapport du nombre de neurones ChAT positifs du côté lésé sur le nombre de neurones ChAT positifs du côté non lésé.

Analyse comportementale

Il est connu qu'une lésion bilatérale de la voie septo-hippocampique conduit à des déficits mnésiques. Afin d'évaluer les effets fonctionnels protecteurs d'une injection d'adénovirus Ad-BDNF sur ce type de lésion, les performances mnésiques des animaux sont analysées au cours de 2 tests comportementaux : le test de la piscine de Morris (mémoire de référence visuo-spatiale) et le test TMTT ("two-trials memory task"; "mémoire à court-terme d'un environnement nouveau").

25 Exemple 7 : Transfert in vivo du gène BDNF par un adénovirus recombinant à des rats présentant une lésion de la voie nigro-striée

Cet exemple décrit le transfert du gène BDNF in vivo au moyen d'un vecteur adénoviral selon l'invention. Il montre sur un modèle animal de la lésion de la voie nigro-striée, que les vecteurs de l'invention permettent d'induire l'expression in vivo de quantités thérapeutiques de BDNF.

5 Sur des rats préalablement anesthésiés, la voie nigro-striée a été lésée au niveau du faisceau mésencéphalique médian (MFB) par injection de la toxine 6-hydroxy dopamine (6OH-DA). Cette lésion chimique par injection a été unilatérale, suivant les coordonnées stéréotaxiques suivantes : AP : 0 et -1; ML : +1,6; V : -8,6 et -9 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée
10 V par rapport à la dure-mère). La barre d'incisive est fixée au niveau +5 mm.

L'adénovirus recombinant BDNF a été injecté immédiatement après la lésion, dans la substance noire et le striatum, du côté de la lésion. Plus particulièrement, l'adénovirus injecté est l'adénovirus Ad-BDNF préparé dans l'exemple 4.1., utilisé sous forme purifiée ($3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l), dans une solution saline
15 phosphate (PBS).

Les injections ont été réalisées à l'aide d'une canule (diamètre extérieur 280 μ m) connectée à une pompe. La vitesse d'injection est fixée à 0,5 μ l/min, après quoi, la canule reste en place pendant 4 minutes supplémentaires avant d'être remontée. Les
20 volumes d'injection dans le striatum et la substance noire sont respectivement 2x3 μ l et 2 μ l. La concentration d'adénovirus injectée est de $3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l.

Pour l'injection dans la substance noire, les coordonnées stéréotaxiques sont les suivantes : AP=-5,8; ML=+2; V=-7,5 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée V par rapport à la dure-mère).

25 Pour les injections dans le striatum, les coordonnées stéréotaxiques sont les suivantes : AP=+0,5 et -0,5; ML=3; V=-5,5 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée V par rapport à la dure-mère).

Les effets thérapeutiques de l'administration de l'adénovirus selon l'invention ont été mis en évidence par trois types d'analyse : une analyse histologique et
30 immunohistochimique, une analyse quantitative et une analyse comportementale.

Analyse histologique et immunohistochimique

La lésion chimique de la voie nigro-striée induit une perte neuronale dans la substance noire ainsi que la dénervation dopaminergique dans le striatum (révélées en immunohistologie par un anticorps anti-tyrosine hydroxylase, TH).

- 5 L'analyse histologique des cerveaux injectés est réalisée 3 semaines après l'injection intracérébrale de l'adénovirus Ad-BDNF dans les conditions décrites dans l'exemple 6. Les coupes sériées coronales de 30 μm d'épaisseur sont réalisées dans la substance noire et le striatum. Des coupes espacées de 180 μm (1 coupe sur 6) sont colorées au crésyl violet (pour évaluer la densité neuronale) et immunomarquées par
10 un anticorps anti tyrosine hydroxylase (TH) (pour détecter les neurones dopaminergiques dans la substance noire et leur innervation dans le striatum).

Analyse quantitative

- Le nombre de neurones dopaminergiques (TH positifs), dans la substance noire est le paramètre d'évaluation des effets de l'adénovirus Ad-BDNF. Le
15 dénombrement est réalisé sur un échantillon (1 coupe sur 6 sur toute la longueur de la substance noire). Pour chaque coupe, les neurones TH positifs sont dénombrés séparément des 2 cotés de la substance noire. Les résultats cumulés pour toutes les coupes sont exprimés en proportion : nombre de neurones TH positifs du côté lésé par rapport au nombre de neurones TH positifs du côté non lésé.

20 Analyse comportementale

- Afin d'évaluer les effets fonctionnels protecteurs d'une injection d'adénovirus Ad-BDNF sur la lésion de la voie nigro-striée, les performances sensori-motrices des animaux sont analysées au cours de 2 tests comportementaux : le test de la rotation induite par des agonistes dopaminergiques (apomorphine, amphétamine et lévodopa),
25 et le test de préhension ("paw-reaching").

Exemple 8 : Transfert in vivo du gène BDNF par un adénovirus recombinant à des rats présentant une lésion de la voie perforante

- Cet exemple décrit le transfert du gène BDNF in vivo au moyen d'un vecteur adénoviral selon l'invention. Il montre sur un modèle animal de la lésion de la voie
30 perforante, que les vecteurs de l'invention permettent d'induire l'expression in vivo de quantités thérapeutiques de BDNF.

Sur des rats préalablement anesthésiés, la voie entorhino-hippocampique (voie perforante) a été sectionnée unilatéralement à l'aide d'un couteau chirurgical. Les coordonnées stéréotaxiques utilisées à cet effet sont, par rapport au lambda : AP : +0,75; ML : +4,1 à 6,6; V : -7,7 (coordonnée V déterminée par rapport à la dure-mère).

L'adénovirus recombinant BDNF est injecté immédiatement après la lésion, soit au niveau de la lésion, soit au niveau de l'hippocampe et du cortex entorhinal. Plus particulièrement, l'adénovirus injecté est l'adénovirus Ad-BDNF préparé dans l'exemple 4.1., utilisé sous forme purifiée ($3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l), dans une solution saline phosphate (PBS).

Les injections ont été réalisées à l'aide d'une canule (diamètre extérieur 280 μ m) connectée à une pompe. La vitesse d'injection est fixée à 0,5 μ l/min, après quoi, la canule reste en place pendant 4 minutes supplémentaires avant d'être remontée. Les volumes d'injection dans l'hippocampe, le cortex entorhinal et le site de lésion de la voie perforante sont respectivement 3 μ l, 2 μ l et 2 μ l. La concentration d'adénovirus injectée est de $3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l.

Les effets thérapeutiques de l'administration de l'adénovirus selon l'invention peuvent être mis en évidence par une analyse comportementale dans les conditions de l'exemple 6.

REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) ou un dérivé de celui-ci.
2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour le prépro-BDNF.
3. Adénovirus selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNc.
4. Adénovirus selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNg.
5. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour le prépro-BDNF humain.
6. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules nerveuses.
7. Adénovirus selon la revendication 6 caractérisé en ce que les signaux d'expression sont choisis parmi les promoteurs viraux, de préférence parmi les promoteurs E1A, MLP, CMV et LTR-RSV.
8. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour le prépro-BDNF humain sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.
9. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNg codant pour le prépro-BDNF humain sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.
10. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF) ou un dérivé de celui-ci sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans les cellules nerveuses.
11. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 10 caractérisé en ce que le promoteur est choisi parmi le promoteur de l'énolase neurone spécifique et le promoteur de la GFAP.

12. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 11 caractérisé en ce qu'il est dépourvu des régions de son génome qui sont nécessaires à sa réplication dans la cellule cible.

5 13. Adénovirus selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il comprend les ITR et une séquence permettant l'encapsidation, et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 sont non fonctionnels.

14. Adénovirus selon la revendication 12 ou 13 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus humain de type Ad 2 ou Ad 5 ou canin de type CAV-2.

10 15. Utilisation d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 14 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives.

16. Utilisation selon la revendication 15 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention de la maladie de Parkinson, d'Alzheimer, de Huntington ou de l'ALS.

15 17. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 14.

18. Composition pharmaceutique selon la revendication 17 caractérisée en ce qu'elle est sous forme injectable.

20 19. Composition pharmaceutique selon la revendication 17 ou 18 caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml adénovirus recombinants défectifs.

20. Cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 14.

25 21. Cellule selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine.

22. Cellule selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine de type fibroblaste, myoblaste, hépatocyte, cellule endothéliale, cellule gliale ou kératynocyte.

23. Implant comprenant des cellules infectées selon les revendications 20 à 22 et une matrice extracellulaire.

24. Implant selon la revendication 23 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant choisi de préférence parmi le
5 collagène, la gélatine, les glucosaminoglycans, la fibronectine et les lectines.

25. Implant selon les revendications 23 ou 24 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend également un support permettant l'ancrage des cellules infectées.

26. Implant selon la revendication 25 caractérisé en ce que le support est
10 constitué préférentiellement par des fibres de polytétrafluoroéthylène.

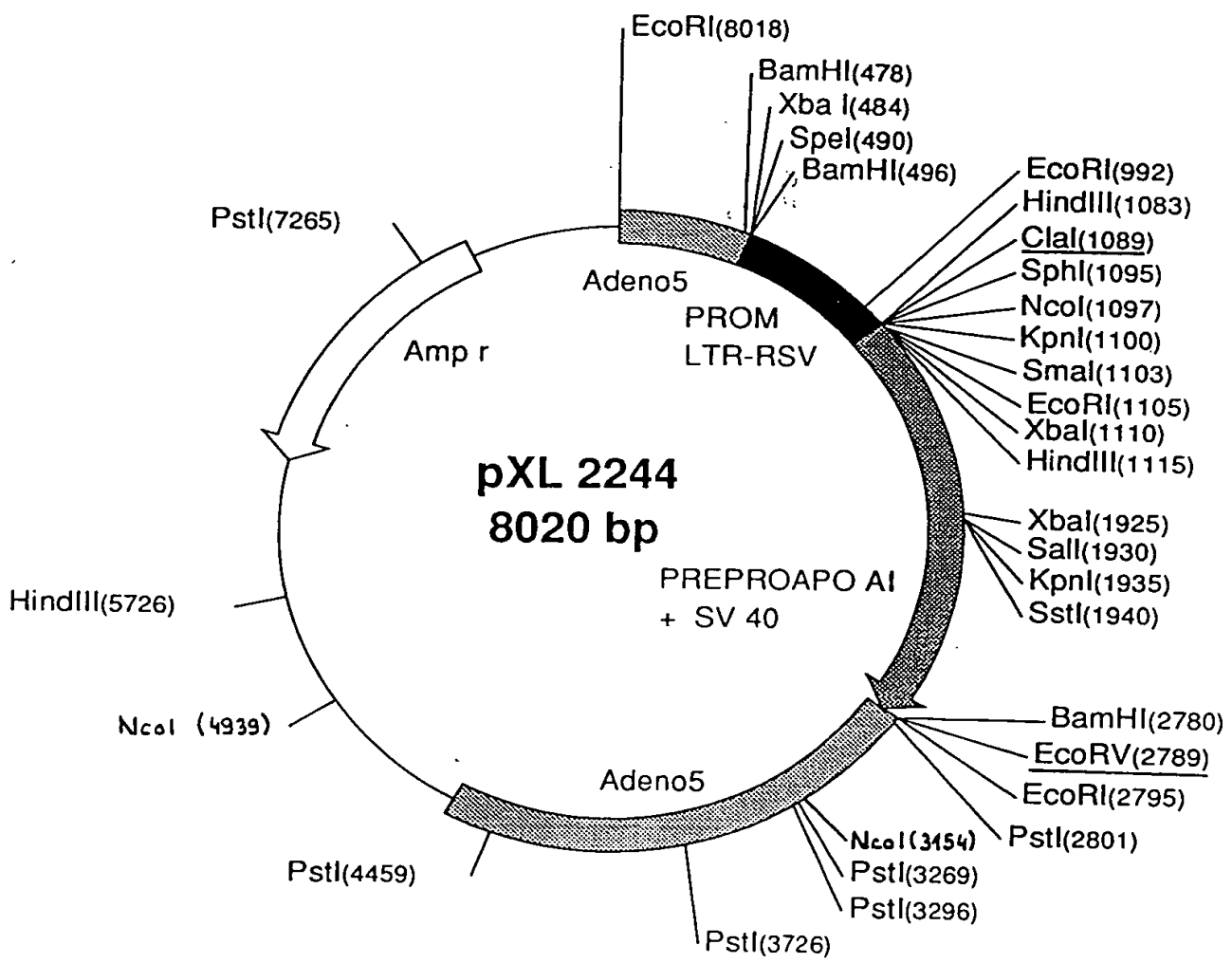


Figure 1

2/2

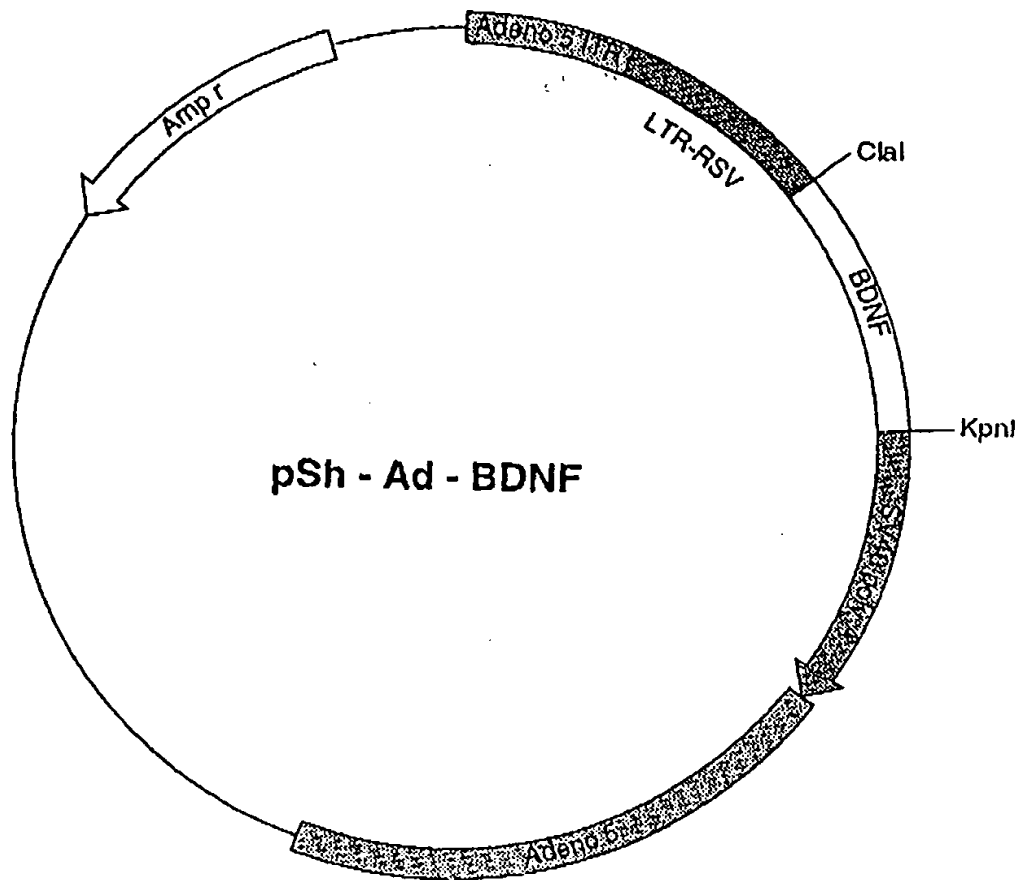


FIGURE 2



TECH CENTER 1600/2900

MAY 28 2002

RECEIVED

CERTIFICATION OF TRANSLATION

The undersigned, Jessica T. Abreu, whose address is 2334 N. Van Buren Court, Arlington, VA 22205-1939, USA, declares and states as follows:

I am well acquainted with the English and French languages; I have in the past translated numerous French documents of legal and/or technical content into English; and I am certified by Georgetown University and accredited by the American Translators Association in French into English translation.

I have been asked to translate and/or review a 23-page French patent application, containing 2 additional pages of figures, with a national registration number of 94 03191, filed on March 18, 1994, and entitled: "VIRUS RECOMBINANTS, PREPARATION ET UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE." Inventors: Pradier, Barnoud, Delacere, Perricaudet and Vigne. Applicant: Rhone-Poulenc Rorer SA.

I hereby declare that the attached translation of the document referenced above is, to the best of my knowledge and ability, a true and accurate translation of the original French document.

And I declare further that all statements made herein of my own knowledge are true, that all statements made on information and belief are believed to be true, and that falsification of these statements and the like is punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code.

I therefore attach my Certification of Translation to the English translation of this document.

May 22, 2002

Date

Jessica T. Abreu

City/County of Arlington
Commonwealth of Virginia

The foregoing instrument was subscribed and sworn to before me on this
22nd day of May 2002 by

Notary Public

Divina A. Rutherford
Notary Public

My commission expires on: Commonwealth of Virginia
My Commission Expires Sept 30 2004





RECEIVED
MAY 28 2002
TECH CENTER 1600/2900

1

RECOMBINANT ADENOVIRUSES
PREPARATION AND USE IN GENE THERAPY

- The present invention relates to recombinant vectors of viral origin and to
- 5 their use for the treatment and/or prevention of neurodegenerative diseases. More particularly, it relates to recombinant adenoviruses containing a DNA sequence encoding brain-derived neurotrophic factor (BDNF, brain-derived neurotrophic factor). The invention also relates to the preparation of these vectors, to pharmaceutical compositions containing them and to their therapeutic use, particularly in gene therapy.
- 10 Neurodegenerative diseases represent a substantial part of health expenditure in Western countries, a part which is increasingly rising as a result of the aging of the population. As examples of these conditions, particular mention may be made of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's chorea, amyotrophic lateral sclerosis and the like. The pathological signs and the etiology of these diseases are quite
- 15 varied, but all these diseases result from a gradual loss of neuron cells in the central nervous system, sometimes in highly localized structures such as the black substance in Parkinson's disease. Although some palliative pharmacological treatments are already available, their effects are relatively limited. The present invention describes a new, particularly advantageous, therapeutic approach for the treatment of these diseases. More
- 20 particularly, the present invention describes vectors which make it possible to directly promote the survival of the neuron cells implicated in these pathologies, by the effective and localized expression of certain trophic factors.

- Trophic factors are a class of molecules having properties for stimulating neuritic growth or the survival of nerve cells. The first factor possessing neurotrophic
- 25 properties, NGF (Nerve Growth Factor), was characterized about forty years ago (for a review, see Levi-Montalcini and Angelletti, *Physiol. Rev.* 48 (1968) 534). It was only recently that other neurotrophic factors were identified, and particularly the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Thoenen, *Trends in NeuroSci.* 14 (1991) 165). BDNF is a protein with 118 amino acids and a molecular weight of 13.5 kD. In vitro, BDNF
- 30 stimulates the formation of neurites and the survival in culture of the ganglionic neurons of the retina, the motoneurons of the spinal cord, the



cholinergic neurons of the septum as well as the dopaminergic neurons of the mesencephalon (review by Lindsay in *Neurotrophic Factors*, Ed, (1993) 257, Academic Press). However, although its properties are advantageous, the therapeutic application of BDNF is confronted with various obstacles. In particular, the absence of bioavailability of BDNF limits any therapeutic use. Moreover, there is no effective means allowing BDNF to be delivered in a long-lasting and localized manner to certain desired regions of the body. Finally, it is essential that the BDNF delivered be active and exert a therapeutic activity in vivo.

The present invention provides a particularly advantageous solution to these problems. The present invention indeed consists in the development of particularly effective vectors to deliver in vivo and locally, therapeutically active quantities of BDNF. In copending Application No. PCT/EP93/02519, it has been shown that adenoviruses could be used for transferring genes in vivo into the nervous system. The present invention relates to new constructs which are particularly adapted and effective for transferring a specific gene into the nervous system. More particularly, the present invention relates to a recombinant adenovirus comprising a DNA sequence encoding brain-derived neurotrophic factor (BDNF), to its preparation, and to its use for the treatment and/or prevention of neurodegenerative diseases.

The Applicant has now shown that it is possible to construct recombinant adenoviruses containing a sequence encoding BDNF, to administer these recombinant adenoviruses in vivo, and that this administration allows a stable and localized expression of therapeutically active quantities of BDNF in vivo, and in particular in the nervous system, and without cytopathological effect. The particularly advantageous properties of the vectors of the invention stem in particular from the construction used (defective adenovirus, deleted of certain viral regions), the promoter used for the expression of the sequence encoding BDNF (preferably viral or tissue-specific promoter), and the methods for administering the said vector, allowing the efficient expression, and in the appropriate tissues, of BDNF. The present invention thus provides viral vectors which can be used directly in gene therapy, which are particularly adapted and efficient for directing the expression of BDNF in vivo. The present invention thus offers a particularly advantageous new approach for the treatment and/or prevention of neurodegenerative diseases.

A first subject of the invention therefore consists in a defective recombinant adenovirus comprising a DNA sequence encoding brain-derived neurotrophic factor (BDNF) or a derivative thereof.

5 The subject of the invention is also the use of such a defective recombinant adenovirus for the preparation of a pharmaceutical composition intended for the treatment or prevention of neurodegenerative diseases.

The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) produced in the context of the present invention may be human BDNF or animal BDNF. The DNA sequence encoding human BDNF and rat BDNF has been cloned and sequenced (Maisonpierre et al., Genomics 10 (1991) 558), as well as particularly the sequence encoding pig BDNF (Leibrock et al., Nature 341 (1989) 149). Prior to their incorporation into an adenovirus vector according to the invention, these sequences are advantageously modified, for example by site-directed mutagenesis, in particular for the insertion of appropriate restriction sites. The sequences described in the prior art are indeed not constructed for use according to the invention, and prior adaptations may prove necessary, in order to obtain substantial expressions (see Example 1.2.). In the context of the present invention, it is preferable to use a DNA sequence encoding human brain-derived neurotrophic factor (hBDNF). Moreover, as indicated above, it is also possible to use a construct encoding a derivative of BDNF, in particular a derivative of human BDNF. Such a derivative comprises for example any sequence obtained by mutation, deletion and/or addition compared to the native sequence, and encoding a product conserving at least one of the biological properties of BDNF (trophic and/or differentiator effect). These modifications can be carried out by techniques known to persons skilled in the art (see general molecular biology techniques below and Example 2). The biological activity of the derivatives thus obtained can then be easily determined, as indicated in Example 3. The derivatives according to the invention can also be obtained by hybridization from nucleic acid libraries, using as probe the native sequence or a fragment thereof.

These derivatives are, in particular, molecules having a greater affinity for their binding sites, sequences permitting an enhanced expression in vivo, molecules having greater resistance to proteases,

molecules having greater therapeutic efficacy or fewer side effects, or possibly new biological properties.

Among the preferred derivatives, mention may be made, more particularly, of natural variants, molecules in which one or more residues have been substituted, derivatives obtained by deletion of regions having no, or little, involvement in the interaction with the binding sites considered or expressing an undesirable activity, and derivatives containing, compared with the native sequence, additional residues, such as for example a secretion signal and/or a joining peptide. In a particularly advantageous manner, the sequence of the present invention encodes the BDNF preceded by the native pro region (pro BDNF).

Moreover, it is particularly important, for a better implementation of the present invention, for the sequence used also to contain a secretion signal which makes it possible to direct the synthesized BDNF in the secretory pathways of the infected cells, so that the synthesized BDNF is released in the extracellular compartments and can activate its receptors. The secretion signal is advantageously the BDNF signal itself. But it may also be a heterologous or even artificial secretion signal.

The DNA sequence encoding the brain-derived neurotrophic factor used in the context of the present invention may be a cDNA, a genomic DNA (gDNA) or a hybrid construct consisting for example of a cDNA in which one or more introns could be inserted. This may also be synthetic or semisynthetic sequences. It should be noted that in the genomic sequence encoding BDNF, the introns are located in the non-coding regions. In a particularly advantageous manner, a cDNA or a gDNA is used. In particular, the use of a gDNA can permit an enhanced expression in human cells.

In a first embodiment of the invention, the adenovirus therefore comprises a cDNA sequence encoding brain-derived neurotrophic factor (BDNF). In another preferred embodiment of the invention, the adenovirus comprises a gDNA sequence encoding brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Advantageously, the DNA sequence encodes proBDNF and, preferably, preproBDNF.

Advantageously, the sequence encoding BDNF is placed under the control of signals permitting its expression in nerve cells. Preferably, they are heterologous expression signals, that is to say signals different from those which are naturally responsible for the expression of BDNF. They may be in particular sequences responsible for the expression of other proteins, or of synthetic sequences. In particular, they may be promoter sequences of eukaryotic or viral genes. For example, they may be promoter sequences derived from the genome of the cell which it is desired to infect. Likewise, they may be promoter sequences derived from the genome of a virus, including the adenovirus used. In this respect, mention may be made, for example, of the E1A, MLP, CMV, RSV-LTR promoters and the like. In addition, these expression sequences can be modified by the addition of activation or regulatory sequences or sequences permitting a tissue-specific expression. It may indeed be particularly advantageous to use expression signals which are active specifically or predominantly in the nerve cells, so that the DNA sequence is expressed and produces its effect only when the virus has actually infected a nerve cell. In this respect, mention may be made, for example, of neuron-specific enolase promoters, GFAP promoters and the like.

In a first specific embodiment, the invention relates to a defective recombinant adenovirus comprising a cDNA sequence encoding human brain-derived neurotrophic factor (hBDNF) under the control of the RSV-LTR promoter.

In another specific embodiment, the invention relates to a defective recombinant adenovirus comprising a gDNA sequence encoding human brain-derived neurotrophic factor (hBDNF) under the control of the RSV-LTR promoter.

The Applicant has indeed shown that the Rous sarcoma virus (RSV) LTR promoter allowed long-lasting and substantial expression of BDNF in the cells of the nervous system and in particular the central nervous system.

Still in a preferred embodiment, the invention relates to a defective recombinant adenovirus, having a DNA sequence encoding human brain-derived neurotrophic factor (hBDNF) under the control of a promoter allowing predominant expression in the nervous system. A particularly preferred embodiment of the present invention consists in a defective recombinant adenovirus comprising the ITR sequences, a sequence allowing encapsidation, a DNA sequence encoding

human brain-derived neurotrophic factor (hBDNF) or a derivative thereof under the control of a promoter allowing predominant expression in the nervous system and in which the E1 gene and at least one of the E2, E4 and L1-L5 genes is non-functional.

5 The defective adenoviruses according to the invention are adenoviruses which are incapable of replicating autonomously in the target cell. Generally, the genome of the defective adenoviruses used in the context of the present invention therefore lacks at least the sequences necessary for the replication of the said virus in the infected cell. These regions can be either removed (completely or partly), or rendered non-functional, or substituted by other sequences and in particular by the DNA sequence encoding BDNF.

10 Preferably, the defective virus of the invention conserves the sequences in its genome which are necessary for the encapsidation of the viral particles. Still more preferably, as indicated above, the genome of the defective recombinant virus according to the invention comprises the ITR sequences, a sequence allowing encapsidation, the non-functional E1 gene and at least one non-functional E2, E4 or L1-L5 gene.

15 There are various adenovirus serotypes, whose structure and properties vary somewhat. Among these serotypes, the use of the type 2 or 5 human adenoviruses (Ad 2 or Ad 5) or of adenoviruses of animal origin (see Application FR 93 05954) is preferred in the context of the present invention. Among the adenoviruses of animal origin which can be used in the context of the present invention, mention may be made of
20 adenoviruses of canine, bovine, murine (Example: Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, avian or alternatively simian (Example: SAV) origin. Preferably, the adenovirus of animal origin is a canine adenovirus, or, more preferably, a CAV2 adenovirus [Manhattan strain or A26/61 (ATCC VR-800) for example]. Preferably, adenoviruses of human or canine or mixed origin are used in the context of the invention.

25 The defective recombinant adenoviruses according to the invention can be prepared by any technique known to a person skilled in the art (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). In particular, they can be prepared by homologous recombination between an adenovirus and a plasmid carrying, inter alia, the DNA sequence encoding BDNF. The homologous recombination occurs
30 after co-transfection of the said adenoviruses and

plasmid into an appropriate cell line. The cell line used should preferably (i) be transformable by the said elements, and (ii) contain the sequences capable of complementing the defective adenovirus genome part, preferably in integrated form in order to avoid risks of recombination. As an example of a cell line, mention may be made of the human embryonic kidney line 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) which contains in particular, integrated in its genome, the left hand part of the genome of an Ad5 adenovirus (12%). Strategies for constructing vectors derived from adenoviruses have also been described in Applications Nos. FR 93 05954 and FR 93 08596 which are incorporated herein by way of reference.

Next, the adenoviruses which have multiplied are recovered and purified according to conventional molecular biology techniques as illustrated in the examples.

As indicated above, the present invention also relates to any use of an adenovirus as described above for the preparation of a pharmaceutical composition intended for the treatment and/or prevention of neurodegenerative diseases. More particularly, it relates to any use of these adenoviruses for the preparation of a pharmaceutical composition intended for the treatment and/or prevention of Parkinson's disease, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Huntington's disease, epilepsy and vascular dementia.

The present invention also relates to a pharmaceutical composition containing one or more defective recombinant adenoviruses as described above. These pharmaceutical compositions can be formulated for topical, oral, parenteral, intranasal, intravenous, intramuscular, subcutaneous, intraocular or transdermal administration and the like. Preferably, the pharmaceutical compositions of the invention contain a pharmaceutically acceptable vehicle for an injectable formulation, in particular for a direct injection into the patient's nervous system. This may be, in particular, isotonic sterile solutions, or dry, in particular freeze-dried, compositions which, upon addition, depending on the case, of sterilized water or physiological saline, permit the preparation of injectable solutions. Direct injection into the patient's nervous system is advantageous since it makes it possible to concentrate the therapeutic effect in the affected tissues.

Direct injection into the patient's central nervous system is

advantageously carried out by means of a stereotaxic injection apparatus. The use of such an apparatus makes it possible to target the injection site with great precision.

In this respect, the invention also relates to a method for treating neurodegenerative diseases comprising the administration to a patient of a recombinant adenovirus as defined above. More particularly, the invention relates to the method for treating neurodegenerative diseases comprising the stereotaxic administration of a recombinant adenovirus as defined above.

The doses of defective recombinant adenovirus used for the injection can be adjusted according to various parameters, and in particular according to the mode of administration used, the pathology concerned, or alternatively the desired duration of treatment. Generally, the recombinant adenoviruses according to the invention are formulated and administered in the form of doses of between 10^4 and 10^{14} pfu/ml, and preferably 10^6 to 10^{10} pfu/ml. The term pfu (plaque forming unit) corresponds to the infectivity of a virus solution, and is determined by infecting an appropriate cell culture, and then measuring, generally after 48 hours, the number of plaques of infected cells. The techniques for determining the pfu titer of a viral solution are well documented in the literature.

Another subject of the invention relates to any mammalian cell infected by one or more defective recombinant adenoviruses as described above. More particularly, the invention relates to any human cell population infected by these adenoviruses. They may be in particular fibroblasts, myoblasts, hepatocytes, keratinocytes, endothelial cells, glial cells and the like.

The cells according to the invention can be obtained from primary cultures. They can be collected by any technique known to a person skilled in the art and then cultured under conditions permitting their proliferation. As regards more particularly fibroblasts, these can be easily obtained from biopsies, for example according to the technique described by Ham [Methods Cell. Biol. 21a (1980) 255]. These cells can be used directly for infection by the adenoviruses, or preserved, for example by freezing, for establishing autologous libraries for subsequent use. The cells according to the invention may also be secondary cultures obtained for example from pre-established libraries.

The cultured cells are then infected with recombinant adenoviruses, so as to confer on them the capacity to produce BDNF. The infection is



• • • •

carried out in vitro according to techniques known to persons skilled in the art. In particular, according to the type of cells used and desired number of virus copies per cell, persons skilled in the art can adjust the multiplicity of infection and optionally the number of cycles of infection performed. It is clearly understood that these steps should be carried out under appropriate sterile conditions when the cells are intended for administration in vivo. The recombinant adenovirus doses used for the infection of the cells can be adjusted by persons skilled in the art according to the desired aim. The conditions described above for administration in vivo can be applied to infection in vitro.

Another subject of the invention relates to an implant comprising mammalian cells infected with one or more defective recombinant adenoviruses as described above, and an extracellular matrix. Preferably, the implants according to the invention comprise 10^5 to 10^{10} cells. More preferably, they comprise 10^6 to 10^8 cells.

More particularly, in the implants of the invention, the extracellular matrix comprises a gelling compound and optionally a support permitting anchorage of the cells.

For the preparation of the implant according to the invention, various types of gelling agents can be used. The gelling agents are used for the inclusion of the cells in a matrix having the constitution of a gel, and to enhance the anchorage of the cells on the support, where appropriate. Various cell adhesion agents can therefore be used as gelling agents, such as in particular collagen, gelatin, glycosaminoglycans, fibronectin, lectins, and the like. Preferably, collagen is used in the framework of the present invention. This may be collagen of human, bovine or murine origin. More preferably, type I collagen is used.

As indicated above, the compositions according to the invention advantageously comprise a support by permitting anchorage of the cells. The term anchorage designates any form of biological and/or chemical and/or physical interaction resulting in the adhesion and/or binding of the cells on to the support. Moreover, the cells can either cover the support used, or penetrate inside this support, or both. The use of a solid, non-toxic and/or biocompatible support is preferred in the context of the invention. In particular, it is possible to use polytetra-fluoroethylene (PTFE) fibers or a support of biological origin.



1 2 3 4

The implants according to the invention can be implanted at different sites in the body. In particular, the implantation can be carried out in the peritoneal cavity, in the subcutaneous tissue (suprapubic region, iliac and inguinal fossae, and the like), in an organ, a muscle, a tumor, the central nervous system or alternatively under a mucous membrane. The implants according to the invention are particularly advantageous in the sense that they make it possible to control the release of the therapeutic product in the body: this release is first determined by the multiplicity of infection and by the number of implanted cells. Next, the release can be controlled either by the removal of the implant, which permanently stops the treatment, or by the use of regulable expression systems, which make it possible to induce or to repress the expression of the therapeutic genes.

The present invention thus offers a very effective means for the treatment or prevention of neurodegenerative diseases. It is most particularly adapted to the treatment of Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's or ALS diseases. The adenoviral vectors according to the invention have, in addition, substantial advantages linked in particular to their very high efficiency of infection of the nerve cells, which makes it possible to carry out infections using small volumes of viral suspension. Furthermore, the infection by the adenoviruses of the invention is highly localized at the site of injection which avoids the risks of diffusion to the neighboring cerebral structures.

In addition, this treatment may apply both to man and to any animal such as ovines, bovines, domestic animals (dogs, cats and the like), horses, fish and the like.

The present invention will be more completely described with the aid of the following examples which should be considered as illustrative and non-limiting.

Legend to the figures

Figure 1: Representation of the vector pXL2244

Figure 2: Representation of the vector pSh-Ad-BDNF.

General molecular biology techniques

The methods conventionally used in molecular biology, such as preparative extractions of plasmid DNA, centrifugation of plasmid DNA in cesium chloride gradient, agarose or acrylamide gel electrophoresis,

purification of DNA fragments by electroelution, phenol or phenol-chloroform extraction of proteins, ethanol or isopropanol precipitation of DNA in saline medium, transformation in *Escherichia coli* and the like, are well known to persons skilled in the art and are widely described in the literature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual",
 5 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley & Sons, New York, 1987].

The pBR322- and pUC- type plasmids and the phages of the M13 series are of commercial origin (Bethesda Research Laboratories).

For the ligations, the DNA fragments can be separated according to their
 10 size by agarose or acrylamide gel electrophoresis, extracted with phenol or with a phenol/chloroform mixture, precipitated with ethanol and then incubated in the presence of phage T4 DNA ligase (Biolabs) according to the supplier's recommendations.

The filling of the protruding 5' ends can be performed with the Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase I (Biolabs) according to the supplier's specifications.

15 The destruction of the protruding 3' ends is performed in the presence of phage T4 DNA polymerase (Biolabs) used according to the manufacturer's recommendations. The destruction of the protruding 5' ends is performed by a controlled treatment with S1 nuclease.

Site-directed mutagenesis in vitro by synthetic oligodeoxynucleotides can
 20 be performed according to the method developed by Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] using the kit distributed by Amersham.

Enzymatic amplification of the DNA fragments by the so-called PCR technique [Polymerase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. and Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] can be
 25 performed using a DNA thermal cycler (Perkin Elmer Cetus) according to the manufacturer's specifications.

Verification of the nucleotide sequences can be performed by the method developed by Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] using the kit distributed by Amersham.

30 Examples

Example 1: Construction of the vector pSh-Ad-BDNF

This example describes the construction of a vector comprising a DNA sequence encoding BDNF under the control of a promoter consisting of the Rous sarcoma virus LTR (RSV-LTR).

5 1.1. Starting vector (pXL2244): The plasmid pXL2244 contains the ApoAI cDNA under the control of the RSV virus LTR promoter, as well as the Ad5 adenovirus sequences (Figure 1). It was constructed by inserting a ClaI-EcoRV fragment containing the cDNA encoding preproApoAI into the vector pLTR RSV- β gal (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626), digested with the same enzymes.

10 1.2. Cloning of a cDNA encoding prepro-BDNF. The complete cDNA encoding rat prepro-BDNF (790 pb) was cloned from a rat genomic DNA library by the PCR technique, using as primer the following oligonucleotides:

5' oligonucleotide: 5'-TTCATCGAATTCCACCAGGTGAGAAG-3'

3' oligonucleotide: 5'-AATATAATCTAGACAACATAAATCC-3'

15 The 5' region of the sequence obtained was then modified by insertion of a ClaI restriction site, 25 bases upstream of ATG. This site was introduced by PCR by means of the following oligonucleotides:

5' oligonucleotide: 5'-TAGCTTCATCGATTTCCACCAG-3'

3' oligonucleotide: 5'-AATATAATCTAGACAACATAAATCC-3'

20 The sequence thus obtained was then subcloned into the plasmid pCRII (Invitrogen) to generate the plasmid pCRII-BDNF.

1.3. Construction of the vector pSh-Ad-BDNF

This example describes the construction of the vector pSh-Ad-BDNF containing, under the control of the RSV virus LTR, the sequence encoding prepro-BDNF as well as Ad5 adenovirus sequences permitting the recombination in vivo.

25 The vector pCRII-BDNF was digested with the enzymes ClaI and KpnI, and the resulting 0.85 kb fragment, containing the sequence encoding prepro-BDNF, was then isolated and purified by LMP (Low Melting Point) agarose gel electrophoresis. In parallel, the vector pXL2244 was digested with the same ClaI and KpnI restriction enzymes, and then precipitated after inactivation of the latter. The resulting linear vector,
30 previously isolated and purified by agarose gel

electrophoresis, and the 0.85 kb fragment were then ligated in order to generate the vector pSh-Ad-BDNF (Figure 2).

Example 2: Construction of the vector pSh-Ad-BDNFtag

- 5** This example describes the construction of a second vector comprising a fusion DNA sequence encoding BDNF under the control of a promoter consisting of the Rous sarcoma virus LTR (RSV-LTR).

- 10** 2.1. Generation of the fusion DNA: In this example, an alternative form of the DNA sequence encoding prepro-BDNF was constructed. This form was obtained by insertion, at the terminal 3' end of the sequence described in Example 1.2., of a sequence encoding an epitope of seven amino acids (tag) recognized by a commercially available antibody (IBI, Integra Biosciences, Eaubonne, France). The sequence of the region thus fused is the following:

- 15** Arg Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp ***
AGA GGC GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC TAG

C-ter fused seq.
BDNF

- 20** The sequence thus obtained was then subcloned into the plasmid pCRII (Invitrogen) to generate the plasmid pCRII-BDNFtag.

2.2. Construction of the vector pSh-Ad-BDNFtag

- 25** This example describes the construction of the vector pSh-Ad-BDNFtag containing the fusion sequence encoding prepro-BDNF, under the control of the RSV virus LTR, as well as the Ad5 adenovirus sequences permitting the recombination in vivo.

- The vector pCRII-BDNFtag was digested with the enzymes ClaI and KpnI, and the resulting 0.87 kb fragment, containing the sequence encoding
30 prepro-BDNFtag was then isolated and purified by LMP (Low Melting Point) agarose gel electrophoresis. In parallel, vector pXL2244 (Example 1.1.) was digested with the same ClaI and KpnI restriction enzymes, and then precipitated after inactivation of the latter. The resulting linear vector, previously isolated and purified by

agarose gel electrophoresis, and the 0.87 kb fragment were then ligated so as to generate the vector pSh-Ad-BDNFtag.

Example 3. Functionality of the vectors pSh-Ad-BDNF and pSh-Ad-BDNFtag

- 5 The capacity of the vectors pSh-Ad-BDNF and pSh-Ad-BDNFtag to express in cell culture a biologically active form of BDNF was demonstrated by transient transfection of COS1 cells. For this purpose, the cells (2×10^6 cells per dish of 10 cm in diameter) were transfected (8 μ g of vector) in the presence of Transfectam. After 48 hours, the cell culture supernatant was harvested. Serial dilutions (1/200 and 1/50) of this
- 10 supernatant were then added to primary cultures of septum neurons (Hefti et al. In Dissection and Tissue cultures: Manual of the Nervous System (1989) 172, Alan R. Liss, Inc). Trophic effect (cell survival and neuritic growth) on these cultures was observed after staining, and the differentiator effect by assaying the expression of the choline acetyl transferase enzyme (ChAT) according to the technique described by Fonnum (J.
- 15 Neurochem. 24 (1975) 407).

Example 4. Construction of recombinant adenoviruses containing a sequence encoding BDNF

4.1. Construction of the adenovirus Ad-BDNF

- 20 The vector pSh-Ad-BDNF was linearized and cotransfected with a deficient adenoviral vector, into the helper cells (line 293) providing in *trans* the functions encoded by the adenovirus E1 regions (E1A and E1B).
- More specifically, the adenovirus Ad-BDNF was obtained by homologous recombination in vivo between the mutant adenovirus Ad-dl1324 (Thimmappaya et al.,
- 25 Cell 31 (1982) 543) and the vector pSh-Ad-BDNF, according to the following protocol: the plasmid pSh-Ad-BDNF and the adenovirus Ad-dl1324, linearized with the enzyme ClaI, were cotransfected into line 293 in the presence of calcium phosphate, so as to allow the homologous recombination. The recombinant adenoviruses thus generated were selected by plaque purification. After isolation, the recombinant adenovirus DNA was
- 30 amplified in the cell line 293, which produces a culture supernatant containing the unpurified recombinant defective adenovirus with a titer of about 10^{10} pfu/ml.

The viral particles were then purified by cesium chloride gradient centrifugation according to known techniques (see particularly Graham et al., Virology 52 (1973) 456). The adenovirus Ad-BDNF can be preserved at -80°C in 20% glycerol.

4.2. Construction of the adenovirus Ad-BDNFtag

5 The adenovirus Ad-BDNFtag was constructed according to the same protocol as the adenovirus Ad-BDNF, but using as starting vector the vector pSh-Ad-BDNFtag.

Example 5. Functionality of the adenovirus Ad-BDNF

10 The capacity of the adenovirus Ad-BDNF to infect cultured cells and to express in the culture medium a biologically active form of BDNF was demonstrated by infecting human 293 and rat PC12 lines. The presence of active BDNF in the culture supernatant was then determined under the same conditions as in Example 3.

15 These studies make it possible to demonstrate that the adenovirus does indeed express a biologically active form of BDNF in cell culture.

Example 6: Transfer in vivo of the BDNF gene by a recombinant adenovirus to rats with lesion of the fimbria-fornix

20 This example describes the transfer of the BDNF gene in vivo by means of an adenoviral vector according to the invention. It shows, on an animal model of a fimbria-fornix lesion, that the vectors of the invention make it possible to induce the expression in vivo of therapeutic quantities of BDNF.

25 In previously anesthetized rats, the septo-hippocampal pathway (fimbria-fornix) was sectioned at the level of the left hemisphere. This mechanical lesion was made with the aid of a retractable surgical knife. The stereotaxic coordinates used to this effect are, relative to the bregma: AP:-1.7; ML: +1.5; V:-5.5 to -0.5.

The BDNF recombinant adenovirus was injected immediately after the lesion, into the median nucleus of the septum and into the dorsal part of the deafferentated

hippocampus (hippocampus on the lesion side). More particularly, the injected adenovirus is the adenovirus Ad-BDNF prepared in Example 4.1., used in purified form (3.5×10^6 pfu/ μ l), in a phosphate buffered saline solution (PBS).

5 The injections are carried out with the aid of a cannula (external diameter 280 μ m) connected to a pump. The rate of injection is fixed at 0.5 μ l/min, after which, the cannula remains in place for 4 additional minutes before being withdrawn. The volumes of injection into the hippocampus and the septum are respectively 3 μ l and 2 μ l. The adenovirus concentration injected is 3.5×10^6 pfu/ μ l.

10 For injection into the hippocampus, the stereotaxic coordinates are the following: AP = -4; ML = 3.5; V = -3.1 (the AP and ML coordinates are determined relative to the bregma, the V coordinate relative to the surface of the cranial bone at the level of the bregma).

15 For the injection into the septum, the stereotaxic coordinates are the following: AP = 1; ML = 1; V = -6 (the AP and ML coordinates are determined relative to the bregma, the V coordinate relative to the surface of the cranial bone at the level of the bregma. Under this condition, the cannula is at an angle of 9 degrees relative to the vertical (in the mediolateral direction) in order to avoid the median venous sinus.

20 The therapeutic effects of the administration of the adenovirus according to the invention have been demonstrated by three types of analysis: a histological and immunohistochemical analysis, a quantitative analysis and a behavioral analysis.

Histological and immunohistochemical analysis

25 The mechanical lesion of the fimbria-fornix induces a loss of cholinergic neurons (visualized in immunohistology by an anti-choline acetyl transferase, ChAT, antibody) in the median septum, as well as cholinergic denervation in the hippocampus (detected in histochemistry by the acetyl choline esterase, AChE, activity).

30 Histological analysis of the injected brains is carried out 3 weeks after the intracerebral injection of the adenovirus Ad-BDNF. For this purpose, the animals are sacrificed, under anesthesia, by intracardiac infusion of 4% paraformaldehyde. After removal, postfixing and cryoprotection, the brain is sectioned using a cryomat along the coronal plane: coronal serial sections 30 μ m thick are made over the

entire length of the median septum and in the anterior, median and posterior regions of the hippocampus. For the median septum, sections 180 μ m apart (1 section out of 6) are stained with cresyl violet (in order to evaluate the neuronal density) and immunolabeled with an anti-ChAT antibody (Biochem) (so as to identify the cholinergic neurons). The immunohistochemical method is that of streptavidin-biotin peroxidase visualized with DAB. For the hippocampus, sections 180 μ m apart are stained according to the histochemical method for AChE (acetyl choline esterase) so as to detect the cholinergic innervation. The sections are mounted on glass slides.

10 Quantitative analysis

The number of cholinergic neurons (ChAT-positive), in the median septum is the parameter for evaluation of the effects of the adenovirus Ad-BDNF. The count is carried out on a sample (1 section out of 6 over the entire length of the median septum). For each section, the ChAT-positive neurons are counted separately on both sides of the septum. The cumulative results for all the sections are expressed by the ratio of the number of ChAT-positive neurons on the injured side over the number of ChAT-positive neurons on the uninjured side.

Behavioral analysis

It is known that a bilateral lesion of the septo-hippocampal pathway leads to memory deficiency. In order to evaluate the protective functional effects of an injection of adenovirus Ad-BDNF on this type of lesion, the memory performances of the animals were analyzed during 2 behavioral tests: the Morris swimming pool test (visuospatial reference memory) and the TMTT test (two-trials memory task; "short-term memory of a new environment").

Example 7: Transfer in vivo of the BDNF gene by a recombinant adenovirus to rats with lesion of the nigro-striatal pathway

This example describes the transfer of the BDNF gene in vivo by means of an adenoviral vector according to the invention. It shows, in an animal model of the lesion of the nigro-striatal pathway, that the vectors of the invention make it possible to induce the expression in vivo of therapeutic quantities of BDNF.

5 In previously anesthetized rats, the nigro-striatal pathway was injured at the level of the median mesencephalic bundle (MFB) by injection of the toxin 6-hydroxydopamine (6OH-DA). This chemical lesion by injection was unilateral along the following stereotaxic coordinates: AP: 0 and -1; ML: +1.6; V: -8.6 and -9 (the AP and ML coordinates are determined relative to the bregma, the V coordinate relative to the dura mater). The incisive bar is fixed at the +5 mm level.

The recombinant adenovirus BDNF was injected immediately after the lesion, into the black substance and the striatum, on the lesion side. More particularly, the injected adenovirus is the adenovirus Ad-BDNF prepared in Example 4.1., used in purified form (3.5×10^6 pfu/ μ l), in a phosphate buffered saline solution (PBS).

15 The injections were carried out with the aid of a cannula (external diameter 280 μ m) connected to a pump. The rate of injection is fixed at 0.5 μ l/min, after which the cannula remains in place for an additional 4 minutes before being withdrawn. The injection volumes into the striatum and the black substance are $2 \times 3 \mu$ l and 2 μ l respectively. The adenovirus concentration injected is 3.5×10^6 pfu/ μ l.

20 For the injection into the black substance, the stereotaxic coordinates are the following: AP = -5.8; ML = +2; V = -7.5 (the AP and ML coordinates are determined relative to the bregma, the V coordinate relative to the dura mater).

For the injections into the striatum, the stereotaxic coordinates are the following: AP = +0.5 and -0.5; ML = 3; V = -5.5 (the AP and ML coordinates are determined relative to the bregma, the V coordinate relative to the dura mater).

25 The therapeutic effects of the administration of the adenovirus according to the invention were detected by three types of analysis: a histological and immunohistochemical analysis, a quantitative analysis and a behavioral analysis.

30

Histological and immunohistochemical analysis

The chemical lesion of the nigro-striatal pathway induces neuronal loss in the black substance as well as the dopaminergic denervation in the striatum (visualized in immunohistology by an anti-tyrosine hydroxylase, TH, antibody).

- 5 Histological analysis of the injected brains is carried out 3 weeks after the intracerebral injection of the adenovirus Ad-BDNF under the conditions described in Example 6. The coronal serial sections 30 µm thick are made in the black substance and the striatum. Sections 180 µm apart (1 section out of 6) are stained with cresyl violet (so as to evaluate the neuronal density) and immunolabeled with an anti-tyrosine hydroxylase
- 10 (TH) antibody (so as to detect the dopaminergic neurons in the black substance and their innervation in the striatum).

Quantitative analysis

- 15 The number of dopaminergic neurons (TH-positive) in the black substance is the parameter for evaluation of the effects of the adenovirus Ad-BDNF. The count is carried out on a sample (1 section out of 6 over the entire length of the black substance). For each section, the TH-positive neurons are counted separately on both sides of the black substance. The cumulative results for all the sections are expressed as a proportion: number of TH-positive neurons on the injured side relative to the number of
- 20 TH-positive neurons on the uninjured side.

Behavioral analysis

- 25 In order to evaluate the protective functional effects of an injection of adenovirus Ad-BDNF on the lesion of the nigro-striatal pathway, the sensorimotor performances of the animals are analyzed during 2 behavioral tests: the test of rotation induced by dopaminergic agonists (apomorphine, amphetamine and levodopa), and the prehension (paw-reaching) test.

- 30 Example 8: Transfer in vivo of the BDNF gene by a recombinant adenovirus to rats with lesion of the perforating pathway

This example describes the transfer of the BDNF gene in vivo by means of an adenoviral vector according to the invention. It shows, in an animal model of the lesion of the perforating pathway, that the vectors of the invention make it possible to induce the expression in vivo of therapeutic quantities of BDNF.

In previously anesthetized rats, the entorhino-hippocampal pathway (perforating pathway) was unilaterally sectioned with the aid of a surgical knife. The stereotaxic coordinates used to this end are, relative to the lambda: AP: +0.75; ML: +4.1 to 6.6; V: -7.7 (V coordinate determined relative to the dura mater).

5 The recombinant adenovirus BDNF is injected immediately after the lesion, either at the level of the lesion, or at the level of the hippocampus and the entorhinal cortex. More particularly, the injected adenovirus is the adenovirus Ad-BDNF prepared in Example 4.1., used in purified form (3.5×10^6 pfu/ μ l), in a phosphate buffered saline solution (PBS).

10 The injections were carried out with the aid of a cannula (external diameter 280 μ m) connected to a pump. The rate of injection is fixed at 0.5 μ l/min, after which the cannula remains in place for an additional 4 minutes before being withdrawn. The injection volumes into the hippocampus, the entorhinal cortex and the lesion site of the perforating pathway are 3 μ l, 2 μ l and 2 μ l respectively. The adenovirus concentration

15 injected is 3.5×10^6 pfu/ μ l.

The therapeutic effects of the administration of the adenovirus according to the invention can be detected by a behavioral analysis under the conditions of Example 6.

CLAIMS

1. Defective recombinant adenovirus containing a DNA sequence encoding brain-derived neurotrophic factor (BDNF) or a derivative thereof.
2. Adenovirus according to Claim 1, characterized in that the DNA sequence encodes prepro-BDNF.
3. Adenovirus according to Claim 1 or 2, characterized in that the DNA sequence is a cDNA sequence.
4. Adenovirus according to Claim 1 or 2, characterized in that the DNA sequence is a gDNA sequence.
5. Adenovirus according to one of Claims 1 to 4, characterized in that the DNA sequence encodes human prepro-BDNF.
6. Adenovirus according to one of Claims 1 to 5, characterized in that the DNA sequence is placed under the control of signals permitting its expression in nerve cells.
7. Adenovirus according to Claim 6, characterized in that the expression signals are chosen from viral promoters, preferably from the E1A, MLP, CMV and RSV-LTR promoters.
8. Defective recombinant adenovirus comprising a cDNA sequence encoding human prepro-BDNF, under the control of the RSV-LTR promoter.
9. Defective recombinant adenovirus comprising a gDNA sequence encoding human prepro-BDNF, under the control of the RSV-LTR promoter.
10. Defective recombinant adenovirus comprising a DNA sequence encoding human brain-derived neurotrophic factor (hBDNF) or a derivative thereof under the control of a promoter permitting predominant expression in the nerve cells.
11. Defective recombinant adenovirus according to Claim 10, characterized in that the promoter is chosen from the neuron-specific enolase promoter and the GFAP promoter.



12. Adenovirus according to one of Claims 1 to 11, characterized in that it lacks regions of its genome which are necessary for its replication in the target cell.
13. Adenovirus according to Claim 12, characterized in that it

5 comprises the ITRs and a sequence permitting encapsidation, and in which the E1 gene and at least one of the E2, E4 or L1-L5 genes are nonfunctional.
14. Adenovirus according to Claim 12 or 13, characterized in that it is a type Ad 2 or Ad 5 human adenovirus or a CAV-2 type canine adenovirus.
15. Use of an adenovirus according to one of Claims 1 to 14, for the

10 preparation of a pharmaceutical composition intended for the treatment and/or prevention of neurodegenerative diseases.
16. Use according to Claim 15, for the preparation of a pharmaceutical composition intended for the treatment and/or prevention of Parkinson's, Alzheimer's, Huntington's or ALS disease.
17. Pharmaceutical composition comprising one or more defective recombinant adenoviruses according to one of Claims 1 to 14.
18. Pharmaceutical composition according to Claim 17, characterized in that it is in injectable form.
19. Pharmaceutical composition according to Claim 17 or 18,

20 characterized in that it comprises between 10^4 and 10^{14} pfu/ml, and preferably 10^6 to 10^{10} pfu/ml of defective recombinant adenoviruses.
20. Mammalian cell infected with one or more defective recombinant adenoviruses according to one of Claims 1 to 14.
21. Cell according to Claim 20, characterized in that it is a human

25 cell.
22. Cell according to Claim 20, characterized in that it is a human cell of the fibroblast, myoblast, hepatocyte, endothelial cell, glial cell or keratinocyte type.

23. Implant comprising infected cells according to Claims 20 to 22 and an extracellular matrix.
24. Implant according to Claim 23, characterized in that the extracellular matrix comprises a gelling compound chosen preferably from collagen, gelatin, glucosaminoglycans, fibronectin and lectins.
25. Implant according to Claims 23 or 24, characterized in that the extracellular matrix also comprises a support permitting anchorage of the infected cells.
26. Implant according to Claim 25, characterized in that the support consists preferably of polytetrafluoroethylene fibers.

